Untersuchungen zur Transformation von Nagetierzellen durch Adenoviren

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

Dietrich Berdel

Saarbrücken

1972

Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie der
Universität des Saarlandes

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. phil. W. Zimmermann

Untersuchungen zur Transformation von Nagetierzellen durch Adenoviren

I N A U G U R A L D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung der Doktorwürde
der
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

1972

vorgelegt von

Dietrich Berdel

geb. am 22. 2. 1945 in Sulingen

Dekan: Prof. Dr. med. H. Kulenkampff
Referent: Prof. Dr. med. R. Wigand

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Die mündliche Promotionsprüfung wurde am 23. 11. 1972 abgelegt.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	1
Eigene Fragestellung	5
Material und Methode	7
Virus	7
Zellkulturen	9
Medien	11
Andere Methoden	13
Ergebnisse	16
Diskussion	24
Zusammenfassung	29
Tabellen	30
Anlage	37
Abbildungen	39
Literatur	42
Lebenslauf	47
Danksagung	48

Einleitung

Zahlreiche RNS- und DNS-Viren sind onkogen, d. h. sie erzeugen maligne Tumoren, wenn sie Tieren unter geeigneten Bedingungen injiziert werden. Diese Viren sind auch alle zu einer malignen Transformation von Zellen in vitro befähigt. Einige Viren allerdings sind zwar in vivo nicht onkogen, können aber die Zellen einer Gewebekultur transformieren, d.h. die genetische Stabilität dieser Zellen verändern (1, 2, 3, 4, Tab. 1). Viele Untersuchungen dieser Art wurden zuerst in vivo als auch wegen der besser überschaubaren Versuchsbedingungen in vitro durchgeführt (5, 6, 7, 8, 9).

Folgende Kriterien für eine maligne, irreversible Transformation einer Zelle in vitro werden von zahlreichen Autoren in unterschiedlicher Reihenfolge je nach ihrer Bedeutung genannt. Keines davon scheint absolut gültig zu sein (10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17).

1. Morphologische Veränderungen:
   a) Metamorphose von spindelförmigen Fibroblasten zu polygonalen Epithelzellen,
   b) Verschiebung der Kernplasmarelation zugunsten des Kernes (16),
   c) Zunahme der Nukleolenzahl auf 2 bis 5 pro Zelle,
   d) Chromosomenveränderungen (Brüche, Translokationen),

e) Erhöhte Mitoserate,

f) Verkürzter Generationswechsel.

2. Aufgehobene Kontaktinhibition.

Die Zellen wachsen dreidimensional. Es entstehen Zellhaufen, die sog. Foci. Diese Foci sind von Ansammlungen degenerierter Zellen, wie sie auch in nicht mit einem Virus inokulierten Zellkulturen (Kontrollen) vorkommen, in zwei wesentlichen Punkten zu unterscheiden:

1. Ihre Zellgestalt entspricht nicht der der übrigen Kultur,
2. In den Randgebieten des Herdes ist die Zellanordnung kreisförmig und nicht sternförmig wie bei den degenerativen Veränderungen (10).

3. Unbegrenzte Lebensfähigkeit neoplastischer Zellen.

Durch Anlegen von Subkulturen ist es möglich, einen Zellstamm von transformierten Zellen zu züchten.

4. Tumorentstehung nach subkutaner oder intraperitonealer Verimpfung der in vitro transformierten Zellen auf neugeborene Tiere gleicher oder anderer Species.

5. Das Virus ist in toto in den transformierten Zellen nicht mehr nachzuweisen; es fehlt sowohl das Virushüllprotein

als auch das infektiöse Virus selbst (18, 10, 16). (Das gilt nur für transformierende DNS-Viren).

6. Charakteristika, die durch die virusspezifische DNS und die daraus resultierende virusabhängige Proteinbiosynthese bedingt sind (14, 15, 18).

   a) Anwesenheit von T-Antigen,

   b) Gegenwart von Oberflächenantigen (Transplantationsantigen),

   c) Nachweis von virusspezifischer DNS bzw. m-RNS.

Auch die DNS-haltigen menschlichen Adenoviren untersuchte man auf Onkogenität und Transformationsfähigkeit (5, 19, 20, 21, 22, 34). Diese Viren verursachen beim Menschen Erkältungen und andere Erkrankungen des Respirationstraktes (Rhinitis, Tonsillitis, Pharyngitis, Bronchitis und Pneumonien). Sie wurden 1953 zuerst aus den Adenoiden infizierter Kinder isoliert (23). Der Adenovirus Typ 8 ist der Erreger der epidemischen Keratokonjunktivitis. Wegen verschiedener Kriterien wurden die menschlichen Adenoviren in Untergruppen eingeteilt, wie sie die Tabelle 1 wiedergibt.
Auch die qualitativ und quantitativ unterschiedliche Onkogenität führte zu einer Gruppeneinteilung, wobei die einzelnen Untergruppen mit den Buchstaben A-D versehen werden (18, 24, 25, 11). Sie stimmen

weitgehend mit den Untergruppen, die aufgrund der Hämagglutination und anderer Merkmale differenziert wurden, überein (26). Dabei entspricht die Gruppe A der Gruppe IV, die Gruppe B der Gruppe I, die Gruppe C der Gruppe III und die Gruppe D der Gruppe II.

Eigene Fragestellung

Da bis zum Versuchsbeginn mit den menschlichen Adenoviren der Untergruppe II in vivo keine Tumoren erzeugt werden konnten (Tab. 1) und diese Viren auch nicht auf ihre Transformationsfähigkeit in vitro untersucht worden waren, lag es nahe, Transformationsversuche mit den Adenoviren der Untergruppe II in Zellkulturen verschiedener Species durchzuführen. Dabei wurde versucht, verschiedene der oben genannten Kriterien zur Beurteilung einer Transformation heranzuziehen.

1. Finden sich im Vergleich zu den Kontrollen morphologisch veränderte Zellen in den virusinokulierten Kulturen?
2. Fehlt den neoplastischen Zellen die Kontaktinhibition, kommt es also zu Bildung sog. Foci?
3. In welchem Zeitabstand nach der Virusinokulation werden diese Veränderungen beobachtet?
4. Gelingt es die malignen Zellen zu subkultivieren, um so einen Zellstamm zu erhalten?
5. Läßt sich das T-Antigen mit Hilfe der KBR oder der indirekten Immunfluoreszenz nachweisen?

Außerdem sollte untersucht werden

1. welchen Einfluß der Calciumgehalt des Erhaltungsmediums auf die

Entstehung bzw. auf das Fortbestehen der transformierten Zellen hat (10, 11, 17, 32, 35) und

2. ob ein zytopathogener Effekt (CPE) initial auftritt und wie er zu überwinden ist (27, 32).

Grundsätzlich war zu fragen, ob es überhaupt gelingt, mit relativ geringen Erfahrungen auf diesem Gebiet geeignete Voraussetzungen zu schaffen, um auch nur in die Nähe der schwierigen und komplexen Fragestellung zu gelangen.

Material und Methode

Virus:

Die Versuche wurden mit den Prototypen menschlicher Adenoviren vom Typ 2, 4, 9, 19 und 24 durchgeführt. Die Typen 9, 19 und 24 gehören zur Untergruppe II (26). Da die Transformationsaktivität des Typ 4, der in seinen Eigenschaften zwischen den Untergruppen I und III liegt (26), noch nicht untersucht worden war, haben wir dieses Virus hinzugenommen. Der Typ 2 aus der Untergruppe III stammend (26) wurde als Kontrollvirus verwandt, da mit ihm schon ein Transformationssystem entwickelt worden war (11, 13). Die Viren wurden in HeLa- bzw. KB-Zellkulturen vermehrt. Am Tag des maximalen CPE wurde das Virus jeweils durch Einfrieren der Zellsuspension geerntet. Eine hohe, etwa gleichbleibende Viruskonzentration war wichtig. Als Maß diente uns der Infektiositätstiter. Hierfür wurden zunächst HeLa-Zellkulturen verwendet, auf die das Virus in Verdünnungsstufen mit dem Faktor 4 verimpft wurde. Die Ablesung des CPE drei Tage nach Inokulation gibt jedoch nur einen geringen Teil des wirklichen Titers wieder, wenn auch ein Vergleich verschiedener Viruspräparationen des gleichen Typs gut möglich ist. Um diesem Mangel abzuhelfen, wurde bei einigen Typen eine Endpunkttitration in embryonalen Men-

schennierenzellen, der für Adenoviren empfänglichsten Zellart, durchgeführt. Da diese Zellen sehr rar sind, konnten nicht alle Typen darin austitriert werden. Die Befunde finden sich in Tabelle 2. Ihre letzte Spalte gibt als Multiplizität die Zahl der infektiösen Einheiten ($TCID_{50}$ bezogen auf embryonale Menschennierenzellen) annähernd wieder, die bei den Transformationsversuchen mit 0,1 ml je Röhrchen auf die Zellkulturen verimpft wurde. Sie lag bei Typ 19 und 24 und vermutlich ebenfalls bei den Typen 4 und 9 etwa bei 1, also ein infektiöses Virus pro Zelle, bei Typ 2 dagegen wesentlich höher. Die Typisierung wurde mit Hilfe des Neutralisationstests (28) durch die entsprechenden Antiseren auf HeLa-Zellkulturen vorgenommen. Die Anwesenheit AAV (adenovirus associated virus) wurde nicht nachgeprüft. In der Regel wurde 0,1 ml oder 0,2 ml Rohvirus auf die Zellkulturen pipettiert. In 2 Versuchen zentrifugierten wir das Rohvirusmaterial vom Typ 2 und 19 bei 20 000 rpm über 90 min. (Rotor 40, Spinco-L-40) und inokulierten Überstand und Sediment getrennt. Wir wollten so etwas über den zytotoxischen Effekt der löslichen Virusantigene im Vergleich zu den virusgebundenen Antigenen erfahren, auch im Hinblick auf die Vermeidung von Zellschädigungen. In 6 Versuchen wurden einigen Kulturröhrchen zur Kontrolle virusfreie, aufgeschlossene HeLa-Zellen in Suspension hinzugegeben.

Zellkulturen:

Als Ausgangsmaterial für die Zellkulturen dienten Organe von Hamstern, Mäusen und Ratten oder ganze Embryonen dieser Species. Dreimal wurde neugeborenen Hamstern unter sterilen Kautelen Lunge, Milz und Herz entnommen (25, 27). Hamstergehirn wurde einmal, und Rattengehirn zweimal verwandt (16, 27). Einmal wurden Mäuseembryonen und siebenmal Rattenembryonen (10, 11, 25, 29) durch Kaiserschnitt entbunden und in toto zur Herstellung von Zellkulturen benutzt. Alle bisher genannten Tiere stammten aus gemischter Zucht. In 10 weiteren Ansätzen wurden Ratteneingeweide kultiviert (12, 13). Diese Organe wurden neugeborenen Inzuchtratten (2 bis 10 Tage alt) vom Stamm BD (Berlin, Druckrey) IX mit der genetischen Formel CPAH und vom Stamm BD X mit den genetischen Faktoren cpah entnommen. Erbreines Material ist besonders geeignet, da bei Onkogenitätsversuchen die Immunabwehr gegen die injizierten, transformierten Zellen besonders gering ist. Man kann dann solche Versuche auch an Tieren vornehmen, bei denen sich eine Immuntoleranz nicht mehr ohne weiteres erzielen lässt. Außerdem sind die Eigenschaften solcher Tiere insgesamt genauer untersucht, wie z.B. die Höhe der spontanen Tumorrate usw. Diesen isogenen Ratten wurde in 7 Versuchen jeweils Niere (11) und Herz, - diese Organe liefern sehr gute Fibroblastenkulturen, - und in 3 Versuchen jeweils Niere, Herz, Lunge

und Thymus entnommen.

Dieses Ausgangsmaterial wurde dann mit Hilfe einer Schere mechanisch zerkleinert und einer milden Trypsinbehandlung unterzogen. Durch die Trypsinbehandlung erhält man monodisperse Zellsuspensionen, die an sterilen Glasflächen (Rousflaschen, Reagenzröhrchen) haften bleiben und zu einschichtigen Zellrasen, sog. Monolayers, auswachsen. Die Kulturen wurden in gewöhnlichen Reagenzröhrchen angesetzt und zur indirekten Immunfluoreszenz in Leightonröhrchen angelegt. 13 primäre und 9 sekundäre Zellkulturen wurden beimpft (27). Die sekundären Kulturen bildeten einen besonders gleichmäßigen Zellrasen. Die Zellzahl bei Ansatz betrug etwa 300 000/ml (29). Eine zu hohe Zellzahl setzt die Transformationshäufigkeit herab (30). Sobald ein vollständiger Zellrasen entstanden war, wurden die Zellen beimpft. Dies geschah zwischen dem ersten und fünften Tag nach Ansetzen. Zweimal wurden die Zellen schon in suspensiertem Zustand mit dem Virus zusammengebracht, da so der regelmäßig auftretende CPE vermindert werden sollte (32, v.d. NOORDAA, persönliche Mitteilung). Eine Suspension von $6 \cdot 10^6$ Zellen/0,5 ml wurde in zwei Fraktionen zu je 0,25 ml geteilt und jeweils mit 0,25 ml Adenovirus Typ 2 bzw. 19 gemischt und eine halbe Stunde bei 37° in einem Schüttelwasserbad gehalten. Dann wurde diese Zell-Virus-Suspension verdünnt und auf 6 Röhrchen pro Virus verteilt.

In allen Versuchen wurden die Zellkulturen ständig bei 37° C gehalten.

Medien:

Bei den Medien handelt es sich um ausbalancierte Salzlösungen, die mit Aminosäuren und Vitaminen angereichert sind. Als Wachstumsmedium, also in der Zeit, in der sich die Zellen in der log. Phase befinden, wurde ein etwas modifiziertes Eagles-Basalmedium (EBM) (11) mit 2 % Kalbserum verwendet. Bei 3 Versuchen wurde ein Teil der Kulturröhrchen ausschließlich mit diesem EBM ernährt. Als Erhaltungsmedium, also für die Zeit nach der Inokulation, wurde sonst Eagles-Minimum-Essential-Medium (EMEM) benutzt (31). EMEM wurde mit der doppelten sonst üblichen Menge von Aminosäuren und Vitaminen angereichert (29). Außerdem wurde dialysiertes Kalbserum in einer Konzentration von 5 % und in zwei Ansätzen von 2 % hinzugesetzt (11). Zusätzlich enthielt das Medium noch 2 % foetales Rinderserum und Antibiotika (11). Da der Transformationsvorgang selbst (10, 11) oder zumindest das Weiterleben der schon transformierten Zellen (9, 13, 27, 32) mit einer zu hohen Calciumkonzentration des Mediums unvereinbar sein soll, stellten wir zwei in ihrer Calciumkonzentration unterschiedliche EMEMedien her. Medium 1 enthielt 1,3 mM und Medium

2 0,1 mM Calcium (10, 11). Diese Lösungen wurden in 8 Versuchen parallel verwendet, in 4 Versuchen wurde nur Medium 1, und in weiteren 9 Versuchen die beiden Medien hintereinander, zu den Zellkulturen gegeben. In den zuletzt genannten Versuchen wurde etwa 12 Tage nach der Inokulation Medium 1 durch Medium 2 ersetzt. In einem Versuch allerdings wurde nur die Hälfte der Röhrchen auf Medium 2 gesetzt.

Der pH-Wert der Medien sollte weitgehend konstant gehalten werden. Deshalb haben wir bei einer Verschiebung des pH-Wertes entweder das Medium gewechselt oder die pH-Verschiebung durch Begasung mit CO_2 bzw. durch Zugabe von $NaHCO_3$ ausgeglichen. Bei zu regem Stoffwechsel der Kulturen wurde das Medium schnell sauer und verfärbte sich gelb. Dann setzen wir $NaHCO_3$ zu. Meist war der Stoffwechsel eher träge, das Medium war alkalisch, verfärbte sich violett und wir brachten die Röhrchen in eine CO_2-Atmosphäre. Während der letzten 10 Versuche stand uns ein CO_2-Brutschrank zur Verfügung. In ihm wurde der Luft über den Zellkulturen 5 % CO_2 beigemischt. Ein Teil der Röhrchen wurde gleich von Versuchsbeginn unter CO_2 gehalten, ein anderer Teil erhielt das Gas erst in einer späteren Versuchsphase.

Der erste Mediumwechsel wurde 4 bis 24 Stunden nach der Virusinokulation durchgeführt. In zehn Versuchen betrug die Adsorptionszeit 4 Stunden (10, 11), in fünf Versuchen 8 Stunden, in drei Versuchen 16 und in vier Versuchen 24 Stunden (27). In einem Ansatz wechselten

wir die eine Hälfte der Röhrchen nach 5 und die zweite Hälfte nach 12 Stunden zum ersten Mal. Der zweite, dritte und vierte Mediumwechsel erfolgte im Abstand von 24 Stunden. In der folgenden Zeit wurde mindestens einmal wöchentlich gewechselt.

Andere Methoden:

1. Subkulturen:

Wegen der starken Trypsinempfindlichkeit transformierter Zellen führte Stoker ein Trypsin-Versen-Gemisch (0,5 ‰ Trypsin, 0,16 ‰ Versen) als Methode zur Herstellung von Subkulturen ein. Die Zellkulturen, in denen sich transformationsverdächtige Zellen finden, werden mit PBS ohne Calcium und Magnesium, da diese Ionen Versen binden, gewaschen. Dann wird 0,3 bis 0,5 ml des Trypsin-Versen-Gemisches bis zur Abrundung der Zellen ungefähr 2 Minuten direkt auf dem Zellrasen belassen. Darauf werden die Röhrchen umgedreht, so daß der Zellrasen jetzt oben gelegen ist und nicht mehr direkt mit dem Trypsin-Versen-Gemisch in Berührung kommt, und so 5 Minuten in einen Brutschrank (37° C) gestellt. Nun wird das Trypsin-Versen-Gemisch abgegossen und 1 ml EMEM in die Röhrchen pipettiert. Durch leichtes Schütteln erhalten wir eine Zellsuspension, die in ein neues Reagenzröhrchen gegeben wird. Außerdem wurde beim Anlegen der Sub-

kulturen wegen der Calciumempfindlichkeit transformierter Zellen Medium 2 (0,1 mM Ca) benutzt.

2. Indirekte Immunfluoreszenz:

In 2 Versuchen wurden die Zellkulturen in je 50 Leightonröhrchen angelegt (ca. 300 000 Zellen bei Ansatz). Wenn die Zellen der virusinokulierten Kulturen die morphologisch verdächtigen Zeichen einer Transformation zeigten, wurden die Deckgläschen mit einem langen Draht und einer Pinzette herausgenommen. Zum Färben wurden die Gläschen auf ein Drahtgestell gelagert und 10 Minuten in PBS (modifiziert nach Nairn) gewaschen. Dann stellten wir die Deckgläschen zum Trocknen für 15 Minuten in einen Brutschrank. Darauf wurden sie 20 Min. in Aceton fixiert und an der Luft getrocknet, um anschliessend wieder 3 bis 5 Min. in PBS gewaschen zu werden. In einem ersten Ansatz wurden die Kulturen auf den Deckgläschen dann mit unvorbehandeltem Hamsterimmunserum in einer Verdünnung von 1:5 und 1:20 überschichtet und für 45 Min. in einer feuchten Kammer bei Zimmertemperatur belassen. Es folgte ein erneutes Waschen in PBS. Dann wurden die Präparate mit ebenfalls unvorbehandeltem Fluoresceinmarkiertem Antihamsterglobulin (Mikrobiological Associates INC. Bethesda Maryland) in einer Verdünnung von 1:5 für weitere 45 Min. überschichtet. Im folgenden Arbeitsgang wurden die Präparate wieder

für 3 bis 5 Min. in PBS gewaschen. Dann betteten wir die Deckgläschen in 20% Glycerin auf Objektträgern ein. Mikroskopiert wurde mit einem Zeiss-Fluoreszenzmikroskop. Die günstigste Filterkombination wurde durch eine modifizierte Methode nach Boyer (1959) gewählt. Das Immunserum wurde uns freundlicherweise von Dr. R.M.McAllister zur Verfügung gestellt. Er hatte es von tumortragenden Hamstern, denen er kurz nach der Geburt durch den Adenovirus Typ 9 in vitro transformierte Rattenembryozellen injiziert hatte, gewonnen. Die Histologie der Tumorzellen stimmte mit der der in vitro transformierten Zellen überein. Auch die serologischen Teste zeigten, daß das Tumorgewebe von den transformierten Zellen stammte (25).

In einem zweiten Versuch wurde das Immunserum auf nicht beimpften Rattenzellkulturen in einer Verdünnung von 1:5 für zwei Stunden bei 37° und für weitere 16 Stunden bei 4° absorbiert, um es weitgehend von störenden Antikörpern gegen Rattenzellen zu befreien. Es kam hier wieder in einer Verdünnung von 1:5 und 1:20 zur Anwendung. In einem dritten Versuch wurde dann auch das Fluorescein-markierte Antihamsterglobulin in gleicher Weise auf Rattenzellen absorbiert.

Ergebnisse

22 Versuche mit insgesamt 1410 Kulturröhrchen wurden angesetzt bei einer Beobachtungszeit von maximal 6 Monaten. Die Mehrzahl der Ansätze wurde aber nach ca. 3 Monaten beendet. Von den 22 Ansätzen waren 5 mit 171 Röhrchen für die Transformationsuntersuchungen nicht verwertbar, da diese Zellkulturen in ihrer Mehrzahl nicht länger als 10 Tage hielten. Erste transformationsverdächtige morphologische Veränderungen wurden von uns aber erst ab dem 12. Tag beobachtet.
Die Art des Kulturmaterials und die Zahl der verwertbaren, im Vergleich zu der Zahl der ursprünglichen Ansätze sind in Tabelle 3 zusammengestellt. Wir haben einen Ansatz dann als verwertbar betrachtet, wenn mindestens 3 Kulturröhrchen pro Virustyp bzw. Kontrolle 4 Wochen lang hielten. Die Tabelle zeigt, daß mit Ausnahme von Gehirn alle Gewebearten in Bezug auf ihre Lebenserwartung in den ersten 4 Wochen etwa gleich gut als Kulturmaterial zu verwenden sind. Die Zahl der verwertbaren Ansätze war für die Adenovirus-Typen 4, 9, 19 und 24 größer als für den Adenovirus Typ 2. Der Grund hierfür ist wohl in dem besonders starken und schwer unter Kontrolle zu bekommenden CPE zu sehen, der vermutlich auf der bei diesem Virustyp angewendeten höheren Virusdosis beruht (s. Tab. 2). Weiter kommt in dieser Tabelle zum Ausdruck, daß primäre und sekundäre Zellkulturen etwa gleich gut zu verwerten sind.

Über die Haltbarkeit bzw. die Lebensfähigkeit als ein Zeichen für die Qualität der Zellkulturen sagt die Tabelle 3 nichts aus. Wenn nur noch wenig Zellen in einem Röhrchen sichtbar waren, wurde diese Zellkultur aus dem Versuch genommen. Werden nun die noch gut erhaltenen Zellkulturröhrchen pro Monat und Virustyp gezählt, so bekommt man eine Aussage über die Lebensfähigkeit der Zellen unter dem Einfluß bzw. den Auswirkungen des betreffenden Virustypen auf die Zellen. Diese Zusammenhänge sind aus Tabelle 4 zu ersehen. Nach 8 bis 12 Wochen ist bei den mit den Typen 19 und 24 beimpften Zellkulturen noch eine größere Anzahl guter Röhrchen erhalten als bei den unbeimpften Kontrollen zum gleichen Zeitpunkt. Diese geringe Zunahme der noch guten Kulturen nach Beimpfung mit den Typen 19 und 24 ist als Zeichen einer erhöhten Lebensfähigkeit dieser Zellen nicht signifikant genug und eine statistische Auswertung erscheint bei der Heterogenität der Versuchsansätze so nicht sinnvoll zu sein.

Nach 16 Wochen fand sich kein Unterschied mehr im Vergleich zu den Kontrollen. Das liegt zum großen Teil daran, daß von der 12. Woche an die Kulturen, deren Zellen transformationsverdächtige morphologische Veränderungen zeigten, zu weiterführenden Versuchen, wie zum Anlegen von Subkulturen oder zur indirekten Immunfluoreszenz, verwendet wurden.

In wieviel Versuchen transformationsverdächtige morphologisch veränderte Zellansammlungen (Foci) auftraten, zeigt Tabelle 5. Von den 17 verwertbaren Ansätzen waren 14 mit dem Adenovirus Typ 19 beimpfte Zellkulturröhrchen positiv, beim Typ 24 waren es 9, beim Typ 9 noch 7 und beim Typ 2 waren es lediglich 4 Versuchsreihen. Positiv war eine Versuchsreihe pro Virustyp, wenn sich in mehreren Kulturröhrchen sogenannte Foci ausbildeten. Die geringe Ausbeute des Typ 2 ist wiederum durch dessen starken CPE bedingt, der oft eine längere Beobachtungszeit unmöglich machte. Bei 9 verwertbaren Ansätzen mit dem Adenovirus Typ 4 waren 3 positiv.

Über den Transformationseffekt bei den verschiedenen Gewebearten in Abhängigkeit von den 5 untersuchten Adenovirustypen versucht Tabelle 6 etwas auszusagen. Demnach erscheint Rattengewebe, mit Ausnahme von Gehirn, besonders geeignet.

Bei den Kontrollversuchsreihen traten dreimal morphologisch veränderte Zellen auf. Diese Zellansammlungen waren in 2 Ansätzen gut von den sog. Foci abzugrenzen. Ihre Zellen waren zwar epitheloid geformt, ließen aber keine Struktur erkennen. In einem Versuch allerdings war eine Unterscheidung von der Morphologie her kaum möglich. Auch sonst kam es in den Kontrollröhrchen zu Zellanhäufungen. Dabei handelte es sich aber um Zelldetritus. Die mit HeLa-Zellmaterial beimpften Kulturen zeigten keine morphologischen Veränderungen im Vergleich zu den Kontrollen.

An Hand einiger Bilder (siehe Anhang 1) wird nun auf die vom uns beobachteten transformationsverdächtigen morphologischen Veränderungen in den beimpften Zellkulturen eingegangen. Die Zellen der sog. Foci sind nicht mehr langgezogen und spindelförmig, sondern ähneln Epithelzellen. Dieser Unterschied ist besonders auf den Abbildungen 5, 6, 7 und 8 deutlich zu erkennen. Weiter finden wir bei den in ihrer genetischen Stabilität scheinbar veränderten Zellen eine Verschiebung der Kernplasmarelation zugunsten des Kernes und eine Zunahme der Nukleolenzahl. In den "Foci" finden sich Zellen mit mehreren Kernen (Abb. 4 und 12).

Außer diesen, nur auf die einzelne Zelle bezogenen Veränderungen, fehlt den sog. transformierten Zellen die Kontaktinhibition. Es sind Foci entstanden, die aus übereinander wachsenden Zellen von epitheloider Gestalt bestehen. Diese Foci traten bei uns vom 12. bis 38. Tag auf. Und zwar wurden bei den letzten die Foci aus Epithelzellen früher beobachtet als bei den ersten Versuchen.

Leider ist es nicht gelungen, diese fraglich malignen Zellen zu subkultivieren. Unseren Zellen fehlte also ein sehr wesentliches Merkmal maligne transformierter Zellen. Sie hatten keine unbegrenzte Lebensfähigkeit. Von anderen Autoren sind diese Schwierigkeiten während des Zellpassagierens auch beobachtet, aber über-

wunden worden (17, 27). Trotz der milden Behandlung mit dem Trypsin-Versen-Gemisch und einer niedrigen Calciumkonzentration von 0,1 mM konnte von uns kein Zellstamm gewonnen werden. Die Subkulturen von den Zellen der Kontrollen und den Zellen der beimpften Kulturen lebten in 10 Subkultivierungsversuchen etwa gleich lang.
Da kein Zellstamm erhalten werden konnte, waren keine Onkogenitätsversuche in vivo möglich.
Die bisher beschriebenen positiven Kriterien reichten für den Nachweis einer von uns erzielten Transformation nicht aus. Deshalb versuchten wir noch durch die indirekte Immunfluoreszenz ein weiteres positives Charakteristikum, nämlich das sog. T-Antigen, in unseren veränderten Zellen nachzuweisen. Beim ersten Versuch wurden Kontrollkulturen und mit Adenovirus Typ 2, 9 und 19 beimpfte Zellrasen etwa 4 Wochen nach Inokulation präpariert. Neben einer unspezifischen Fluoreszenz in allen Präparaten fanden sich in den Kulturen, die mit den Typen 9 und 19 beimpft worden waren, vermehrt verdächtige Fluoreszenzflecke in einigen Zellen. Daraufhin wurde das Immunserum auf Rattenzellen (Kontrollröhrchen) absorbiert. Im zweiten Versuch beimpften wir die Kulturen mit den Adenovirus Typen 2, 4, 19 und 24. Die Färbung erfolgte etwa 5 Wochen nach der Inokulation. Neben der in allen Präparaten gefundenen unspezifischen Fluoreszenz, ließ sich diesmal in den mit dem Typ 4 und besonders mit den Typen 19

und 24 inokulierten Zellkulturen eine offenbar spezifische Fluoreszenz der Zellen nachweisen. Diese war bei beiden Serumverdünnungen (1:5 und 1:20) gleich stark. Im dritten Ansatz, dessen Bedingungen sich sonst nicht von dem zweiten Versuch unterschieden, wurde auch das Fluorescein-markierte Antihamsterglobulin auf Rattenzellen absorbiert. Hier kam es besonders bei der Immunserumverdünnung von 1:20 in den mit den Typen 19 und 24 beimpften Kulturen zu einer spezifischen, recht intensiven Fluoreszenz. Die Zellen, der mit dem Typ 4 beimpften Kulturen, zeigten diesmal nur eine verdächtige Fluoreszenz. Diese 3 Versuche weisen auf das Vorhandensein eines spezifischen Antigens in unseren beimpften Zellen im Vergleich zu den Zellen in den Kontrollen, die nur eine unspezifische Fluoreszenz erkennen ließen, hin.

Für die Manifestation der Transformation und für das Weiterleben der veränderten Zellen in den Foci spielte der Calciumgehalt des Erhaltungsmediums in unseren Untersuchungen keine Rolle (27). Die "Foci" traten sowohl in den mit Medium 1 als auch in den mit Medium 2 ernährten Zellrasen auf. Ein Umsetzen von Medium 1 auf Medium 2 nach etwa 2 Wochen führte zu keiner Focuszunahme. Auch zeichneten sich die Foci in den mit dem Medium 2 versorgten Kulturen nicht durch eine höhere Lebenserwartung aus. Da wir keine permanente Kultur herstellen konnten, ist eine Aussage über die Bedeutung des

Calciumgehaltes im Erhaltungsmedium für die Fortzüchtung transformierter Zellen nicht möglich.

Ein CPE wurde von allen fünf Virustypen unserer Versuche unabhängig vom Zellmaterial hervorgerufen. Beim Typ 2 war er wegen seiner höheren Dosis stärker als bei den anderen vier Typen, die untereinander einen etwa gleich starken CPE verursachten. Wenn ein Versuch nicht länger als 4 Wochen dauerte, lag dies in den meisten Ansätzen am zu starken CPE. Die wenigen Zellen, die dann noch lebten, reichten nicht mehr aus, um wieder eine Einschichtkultur zu bilden. Der CPE trat vom 2. bis 10. Tag auf, beim Typ 2 früher als bei den anderen Typen.

Ein Problem lag also in der Überwindung des CPE. Es zeigte sich, daß ein früher erster Mediumwechsel (etwa 5 Stunden nach der Inokulation) besser vertragen wurde als ein späterer Wechsel (etwa erst 12 Stunden nach der Inokulation). Der CPE war weniger ausgeprägt, wenn nach dem ersten Mediumwechsel in den folgenden vier Tagen täglich gewechselt wurde, als wenn nur zweimal wöchentlich das Medium ausgetauscht wurde. Daß der CPE bei in Suspension inokulierten Zellen besonders gering sei (32), konnte von uns nicht bestätigt werden. Die auf diese Weise beimpften Zellen waren im Gegenteil nicht langlebig.

Ein Unterschied in der Auswirkung zwischen dem Sediment und dem Überstand eines bei 20.000 rpm zentrifugierten Virus auf die Zellen konnte nicht festgestellt werden. Von beiden Fraktionen wurde ein im Wesentlichen gleicher CPE erzeugt. Zwar traten in den Kulturen, die mit dem Sediment beimpft waren, am 1. Tag etwas mehr Rundzellen auf, doch schon am 2. Tag bestand kein Unterschied mehr zwischen den mit dem Sediment oder dem Überstand inokulierten Zellrasen. Es ist anzunehmen, daß neben dem löslichen, toxischen Antigen auch ein virusgebundenes "Toxin" existiert.

Von den eingesetzten Medien hat sich eindeutig EMEM am besten bewährt. Sowohl die Kontrollen als auch die beimpften Kulturen zeigten auf die Dauer weniger Degenerationserscheinungen, als wir sie bei EBM sahen. Auch das Hinzusetzen von 5 % Kalbserum an Stelle von 2 % zum Medium war für die Zellen von Vorteil, was ihre Haltbarkeit anging. Ein ausgeglichener pH-Wert der Erhaltungsmedien war für die Zellen lebenswichtig. Dieser wurde im CO_2-Brutschrank (in den letzten 10 Versuchen) konstant gehalten. Die Zellkulturen waren nicht nur qualitativ und quantitativ besser erhalten, wenn sie sich von Versuchsbeginn unter einer 5% CO_2 Atmosphäre befanden, sondern sie erholten sich auch wieder unter CO_2, wenn sie vorher ohne dieses leben mußten und vermehrt pH-Schwankungen ausgesetzt waren.

Diskussion

McBRIDE und WIENER erzielten bereits 1964 eine Transformation in vitro von Hamsternierenzellen mit dem menschlichen Adenovirus Typ 12 (20). 1967 transformierte dann FREEMAN Rattenembryozellen mit Typ 2 (11). Es folgte VAN DER NOORDAA, dem zusätzlich die Transformation von Rattenembryozellen mit Typ 1 und 3 gelang (13). Aus drei Untergruppen gab es zu diesem Zeitpunkt also transformationsfähige Adenovirustypen (siehe Tabelle 1). Nachdem unsere Versuche bereits fortgeschritten waren, berichteten McALLISTER et al. (1969), daß es ihnen gelungen sei, mit den Adenoviren der Untergruppe II, und zwar mit den Typen 9, 10, 13, 15, 17, 19 und 26, primäre Rattenembryozellen zu transformieren (25). Mindestens 2 von 5 Typen, die wir untersuchten, waren also transformationsfähig. Für den Typ 2 lag bei Versuchsbeginn schon ein Transformationssystem vor. Weiter ungeklärt war also nur noch die Transformationsfähigkeit der Typen 24 aus der Untergruppe II und 4, der in seinen Eigenschaften zwischen der Untergruppe I und III liegt. Eine Zusammenstellung der Versuchsbedingungen und Ergebnisse bei Transformationsuntersuchungen von Adenoviren findet sich in Tabelle 7.
Die Versuchsergebnisse der in Tabelle 7 erwähnten Autoren hielten den wichtigsten Kriterien, wie sie auf Seite 1, 2 und 3 beschrieben

wurden, stand: Die Zellen waren morphologisch verändert, oft überzeugten die Abbildungen allerdings nicht restlos. Es fand sich eine fehlende Kontaktinhibition. Auch das Charakteristikum der unbegrenzten Lebensfähigkeit wurde in allen Veröffentlichungen der in Tab. 7 angeführten Autoren genannt. Außerdem wurde das T-Antigen in den transformierten Zellen nachgewiesen. Einige Autoren haben auch die virusspezifische m-RNS in den Ribosomen der transformierten Zellen gefunden (11, 29, 25). Der Nachweis der Onkogenität wurde nicht immer erbracht (s. Tab. 7). Weitere Kriterien wurden meist nicht untersucht. Unsere relativ bescheidenen Ergebnisse lassen die Subkultivierbarkeit der transformierten Zellen vermissen; Tests auf Onkogenität im Versuchstier konnten aus diesem Grunde nicht durchgeführt werden. Wir waren damit in erster Linie auf die verdächtigen morphologischen Veränderungen der Zellen in den sog. Foci angewiesen. Es wurden morphologisch veränderte Zellen beobachtet; aus spindelförmigen Fibroblasten waren sich mosaikartig zusammenfügende, polygonale Epithelzellen geworden. Hier ist auch zu diskutieren, ob nicht die Fibroblasten der Kultur durch den CPE soweit zerstört wurden, daß bereits vorhandene, aber weitgehend zurückgedrängte Epithelzellen Gelegenheit zu weiterem Wachstum hatten. Es wäre also keine Transformation, sondern eine Selektion eingetreten. Dem ist entgegenzuhalten, daß der CPE bei Auftreten der

morphologisch veränderten Zellen schon überwunden war und sich zwischenzeitlich wieder eine Einschichtkultur aus Fibroblasten ausgebildet hatte.

Auch eine fehlende Kontaktinhibition wurde gefunden; die veränderten Zellen wuchsen dreidimensional und bildeten sog. Foci. Die Zeit des ersten Auftretens dieser Charakteristika vom 12. bis 38. Tag nach der Virusinokulation stimmt mit den Ergebnissen anderer Autoren überein (30, 13, 27, Tab. 7). In den Kontrollkulturen kamen jedoch ähnliche Veränderungen (in einem Versuch) vor, so daß auch diese Kriterien nicht exakt erfüllt sind. Bei den übrigen Autoren sind morphologisch veränderte Zellen in den Kontrollen nicht beschrieben worden.

In einem Versuch fand sich eine schwache und in zwei weiteren eine, so deutlich spezifische Immunfluoreszenz, daß die Anwesenheit eines nur in den virusinokulierten Zellen vorkommenden T-Antigens angenommen werden muß. Gerade in den zuletzt beschriebenen Versuchen zeichneten sich die beimpften Zellen nicht so sehr durch ihre veränderte Morphe, als vielmehr durch ihre starke Vermehrung, aus. Diesen Zellen fehlte die Kontaktinhibition, sie wuchsen übereinander und bildeten so keine Einschichtkultur mehr. Hier konnte man von einer deutlich erhöhten Lebensfähigkeit sprechen. Im Vergleich zu den Kontrollen, in denen nach 8 Wochen kaum noch von einem Zell-

rasen gesprochen werden konnte, fand sich in den mit den Typen 19 und 24 beimpften Kulturröhrchen noch ein überaus kompakter, an einigen Stellen mehrschichtiger Zellrasen. Wenn überhaupt, ist es in diesen letzten Versuchen wohl am ehesten zu einer Transformation gekommen.

Da aber der vollständige Beweis für eine Transformation fehlt, mussten wir uns fragen, welche Faktoren eine Transformation verhindert haben könnten.

1. ist ein Mangelfaktor beim Virus zu suchen. Der Virustiter dürfte ausreichend gewesen sein (s. Tab. 2, 7). Jedoch könnte evtl. das Vorhandensein von AAV im Inokulationsmaterial störend sein, da diese transformationshemmend sein sollen (33).

2. könnte das Medium die Ursache für den negativen Versuchsverlauf bilden, da selbst hergestellte Medien Aminosäuren enthalten, die nicht vollständig frei von toxischen Verunreinigungen sind, was bei Langzeitversuchen eine Rolle spielen könnte.

3. könnte ein Mißlingen der Versuche an der Art der Zellkulturen liegen. Das wird aber kaum der Fall gewesen sein, denn sowohl die Species als auch die verwendeten Organe wurden variiert, so daß die Chance für das Gelingen einer Transformation hier am wenigsten eingeschränkt war.

4. hätten pH-Schwankungen ein Hindernis für eine Transformation darstellen können. Doch gerade in den letzten Versuchen wurde mit Hilfe des CO_2-Brutschrankes der pH-Wert der Medien konstant, im ganz leicht alkalischen Bereich gehalten (17). In diesem Bereich sollen sich transformierte Zellen am besten vermehren (SEEMAYER).

Auch die Methoden wurden immer wieder verändert, so daß die unterschiedlichen Versuchsbedingungen, wie sie von den Autoren beschrieben wurden, entweder kombiniert oder ohne Abänderung übernommen wurden.

Falls trotz der relativ bescheidenen Ergebnisse, der morphologischen Zellveränderungen, der fehlenden Kontaktinhibition und der offenbar spezifischen Immunfluoreszenz, eine Transformation eingetreten war, so wäre nach der Ursache zu fragen, die das Gelingen der Subkultivierung verhindert haben könnte. In 10 Versuchen, in denen die Empfindlichkeit transformierter Zellen weitgehend berücksichtigt wurde, haben wir dafür keine Antwort erhalten.

Zusammenfassung

Um eine neoplastische Transformation in vitro zu erzielen, wurden in 22 Versuchen 1410 Zellkulturen in Reagenzröhrchen angelegt. Als Kulturmaterial dienten uns Organe von Hamstern, Mäusen und Ratten oder ganze Embryonen dieser Spezies. Beimpft wurden die Einschichtkulturen mit den Adenovirustypen 2, 4, 9, 19 und 24, bei einer Beobachtungszeit von maximal 6 Monaten.

Für eine Transformation sprechen:

1. morphologisch veränderte Zellen,
2. eine fehlende Kontaktinhibition, und
3. das Auftreten von T-Antigen in den möglicherweise transformierten Zellen, nachgewiesen mittels Immunfluoreszenz.

Da einerseits eine Subkultivierung nicht gelang und so auch kein Zellstamm erhalten werden konnte und andererseits ähnlich morphologisch veränderte Zellen, wie sie in den beimpften auch in den Kontrollkulturen eines Versuches beobachtet wurden, ist ein schlüssiger Beweis für eine neoplastische Transformation nicht erbracht worden.

Tab. 1: Die Untergruppen der Adenoviren des Menschen zusammengestellt von R. Wigand nach Rosen (1960) und Huebner (1967)

Untergruppe	Typen	HA für Blutzellen von	CPE	Klinische Bedeutung	G + C-Anteil der DNS	Fortsatzlänge (nm)	Onkogenität
I	3,4,7,11,14, 16, 21	Affe (außer 4)	Retraktion	akute inf. Epidemien	mittel	10	mäßig (4:nicht)
II	8,9,10,13, 15, 17, 19, 20, 24, 22-30, 32 - 34	Ratte vollständig (außer 20, 25, 28)	Rundzellen (außer 8)	unbestimmt (außer 8: Epidem. Keratokonjunktivitis)	hoch	12	nur nach in vitro-Transformation
III	1, 2, 5, 6	Ratte unvollständig (+4, 12)	Retraktion	oft latent	hoch	30	nur nach in vitro-Transformation
IV	12, 18, 31	keine (außer 12)	unterschiedlich	unbestimmt	niedrig	30	stark

Tab. 2: Infektiositätstiter der verwendeten Virusvorräte

Adenovirus Typ	Datum	Titer pro 0,2 ml in HeLa (Ablesung 3 Tage nach Inf.)	embryon. Menschennierenzellen	Multiplizität bei Inokulation von 0.1 ml je Kultur §
2	4. 5.69	2560	$10^{8.5}$	500
4	1.11.69	640	n.u. *	
9	12.12.68	160	n.u.	
19	14. 1.69	160	$10^{5.5}$	0.5
24	14. 5.69	320	$10^{6.0}$ +	1

* nicht untersucht

§ 600 000 Zellen/Kulturröhrchen

Tab. 3: Zahl verwertbarer Ansätze pro Virustyp und Zellmaterial

Zellmaterial: Tierart	Gewebe	Ansätze insgesamt	Kontr.	Typ 2	Typ 4	Typ 9	Typ 19	Typ 24
neugeb. Hamster	Lunge, Milz, Herz	3 (2 pr.[c], 1 sek.)	3 (2, 1)	1[1]	∅	2[2]	3 (2, 1)	1[1]
neugeb. Hamster	Gehirn	1	0	0	∅	0	0	0
Mäuseembryonen		1	1	1	∅	1	1	1
Rattenembryonen		7 (3, 4)	5 (3, 2)	3 (2, 1)	1[1][b]	4 (2, 2)	5 (3, 2)	4 (2, 2)
neugeb. Ratten	Niere, Herz	7 (3, 4)	5 (2, 3)	4 (2, 2)	5 (2, 3)	4 (2, 2)	4 (1, 3)	5 (2, 3)
neugeb. Ratten	Niere, Herz, Lunge, Thymus	3 (3)	3	1	3	2	3	2
neugeb. Ratten	Gehirn[a]	2[2]	1	1	∅	1	1	1
	Summe	24	18	11	9	14	17	14

∅: Kein Ansatz gemacht. a: Diese beiden Ansätze liefen bei zwei größeren Versuchen mit.
b: Hier gab es nur 4 Ansätze.
c: pr. = Primärkulturen, sek. = Sekundärkulturen. z.B. von 3 Ansätzen insgesamt sind zwei primärer und einer sekundären Ursprungs.

Tab. 4: Anzahl der erhaltenen Kulturröhrchen über eine Beobachtungszeit von maximal 4 Monaten und mehr, bezogen auf die einzelnen Virustypen.

Virustyp	0 Wochen	4 Wochen	8 Wochen	12 Wochen	16 Wochen
Kontrolle	337=100%	211=62%	84=25%	64=19%	52=15%
2	219=100%	95=43%	56=26%	37=17%	14= 6%
4	120=100%	50=42%	10=8,3%	2=1,6%	2=1,6%
9	204=100%	99=48%	36=18%	35=17%	26=13%
19	302=100%	190=63%	117=3,9%	77=26%	43=14%
24	205=100%	96=47%	65=32%	53=25%	33=16%
HeLa	23=100%	12=52%	4=17%	0	0
Summe	1410=100%	743=53%	372=26%	268=19%	170=12%

Tab. 5: Vorkommen von transformationsverdächtigen Zellansammlungen (Foci) in den einzelnen Versuchen mit verschiedenem Zell- und Virusmaterial.

Versuchsnummer	Zellart	Kontr.	Typ 2	Typ 4	Typ 9	Typ 19	Typ 24	HeLa
1	Haei	-	-		-	-	-	
2	Re+(Rag)	-	-		-	+	+	
3	Re+(")	-	-		+	+	+	
4	Hag	o				o	o	
5	Haei	-	-		-	-	-	
6	Me	-	+		+	+	-	-
7	Haei	-	-		-	++	-	
8	Re	-	-		-	++	+	-
9	Re	(+)	-		-	+	-	-
10	Re (Sus.)		o			o		
11	Re	(+)	-	-	-	+	-	
12	Re	o	o	o	o	o	o	
13	Rei	-	+	+	+	+	++	-
14	Rei	-	-	+	+	+	+	-
15	Rei	o	o	o	o	o	o	o
16	Rei	-	-	+	++	++	++	-
17	Rei	-	-	-	-	-	-	-
18	Rei	-	+	-	-	+	-	
19	Rei	o	o	o	o	o	o	o
20	Rei	+	+	-	+	+	+	
21	Rei	-	-	-	+	++	++	
22	Rei	-	-	-	-	++	++	

Haei = Hamstereingeweide Hag = Hamstergehirn Me = Mäuseembryonen
Re = Rattenembryonen Rag = Rattengehirn Rei = Ratteneingeweide
o = Versuch ist nicht zu werten, da die Kulturen nicht alt genug wurde
- = Keine transformationsverdächtigen morphologischen Veränderungen
+ = Foci mit transformationsverdächtigen morphologischen Veränderungen
= der einzelnen Zellen. Diese Foci wurden in mehreren Röhrchen pro Versuchsreihe beobachtet.
++ = In jedem Kulturröhrchen einer Versuchsreihe findet sich mindestens ein sog. Focus.
(+) = Focusähnliche Zellansammlungen, deren Zellen aber keine Struktur erkennen lassen.

Tab. 6: Anzahl der positiven Versuche mit fraglich transformierten Zellansammlungen (Foci) bei dem verschiedenen Zellmaterial in Abhängigkeit von den fünf Virustypen.

Kulturmaterial		Haei	Me	Rag	Re	Rei
verwertbare Ansätze	Typ	3	1	2	5	8
positive	2	0	1	0	0	3
Ansätze für die	4					3
einzelnen	9	0	1	0	1	5
Virustypen	19	1	1	0	5	7
	24	0	0	0	3	6

Haei = Hamstereingeweide
Me = Mäuseembryonen
Rag = Rattengehirn
Re = Rattenembryonen
Rei = Ratteneingeweide

Tab. 7: Transformation von Gewebekulturzellen durch Adenoviren. Zusammenstellung von Versuchsbedingungen und Ergebnissen einiger Autoren.

	Adeno-virus-typ	Multi-plizi-tät	Zellart	Transformation Tage nach Inokulat.	Effizienz	Onko-geni-tät
Freeman et al. (10)	12	100	Rattenem-bryonen	48	1 Transf./ 7×10^5 i.E.	+
Freeman et al. (11)	2	1000	Rattenem-bryonen	30	+	n.u.
v.d.Noordaa (12)	12	10	Rattennie-renzellen	14-18	+	+
v.d.Noordaa (13)	1 2 3	um 1	Rattennieren-Rattengehirn-zellen	28-42	+	n.u.
Reed (27)	12	1-10	Hamsterembr. Hamstergehirn	29-33	1 Transf./ $10^{4,5}$ i.E.	n.u.
McAllister et al. (29)	1	100	Rattenembry-ozellen	25	1 Transf./ $2,3 \times 10^2$ i.E.	+
McAllister et al. (25)	9,10, 13,15, 17,19	?	Ratten-embryo-zellen	14	1 Transf./ $2,7 \times 10^4$ pfu.	- + a)
Yamane and Kusano (16)	12	?	Hamster-gehirn	15-33	+	n.u.

n.u.: nicht untersucht

i.E.: infektiöse Einheiten

+ : Foci mit transformierten Zellen. Tiere bekamen Tumoren

pfu.: plaque forming units

a) : Nur nach Zusatz von Freund's adjuvans waren die Onkogenitätsversuche positiv.

Anlage 1

Die Abbildungen 1 - 4 wurden von Rattenembryokulturen des 9. Versuches 20 Tage nach der Inokulation mit einer Vergrößerung von 25 x (Abb. 3) und 125 x (Abb. 4) im Hellfeldmikroskop aufgenommen.

Bild 1 zeigt eine Kontrollkultur mit einschichtigem Zellrasen spindelförmiger Fibroblasten. Dazwischen liegen kleine Haufen toter Rundzellen. In Bildmitte findet sich eine Retraktion, in deren Zentrum keine Zellstrukturen mehr erkennbar sind.

Bild 2 zeigt einen sog. Focus mit Typ 19 beimpfter Kultur. Die Zellen haben ihr spindelförmiges Aussehen verloren, sie ähneln jetzt Epithelzellen und wachsen übereinander.

Bild 3 zeigt einen ähnlichen Focus in einer ebenfalls mit Typ 19 inokulierten Kultur.

Bild 4 zeigt einen Ausschnitt aus diesem Focus mit sich mosaikartig zusammenfügenden, polygonalen Zellen und großen Kernen mit mehreren Nukleolen

Die Abbildungen 5 - 12 wurden von Ratteneingeweidekulturen der Versuche 13 und 14 ca. 5 Wochen nach der Inokulation mit einem Phasenkontrastmikroskop gemacht.

Bild 5 und 6 zeigen Fibroblasten in einer Kontrollkultur bei einer Vergrößerung von 80 und 100 x.

Bild 7 zeigt einen Ausschnitt eines Focus in einer mit Typ 24 inokulierten Kultur bei einer Vergrößerung von 150 x.

Bild 8 zeigt einen Ausschnitt eines Focus einer mit Typ 4 beimpften Kultur bei einer Vergrößerung von 150 x.

Bild 9 zeigt einen kleinen Focus in einer mit Typ 19 beimpften Kultur bei einer Vergrößerung von 100 x.

Bild 10 zeigt ein Randgebiet des in Bild 9 beschriebenen Focus, mit etwas abgerundeten Epithelzellen bei einer Vergrößerung von 150 x.

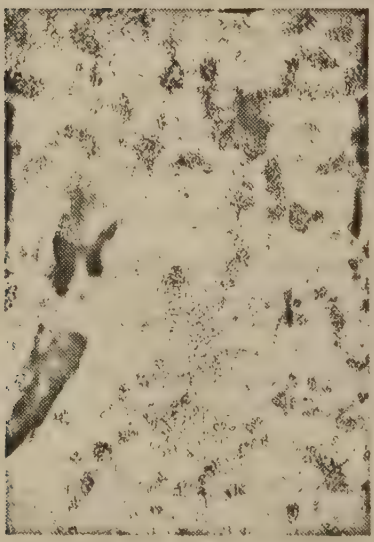
Bild 11 zeigt einen Focus einer mit Typ 9 beimpften Kultur bei einer Vergrößerung von 150 x.

Bild 12: In dieser mit Typ 24 inokulierten Kultur finden sich die gleichen Veränderungen der einzelnen Zellen wie sie auch in Bild 4 zu beobachten waren (Vergrößerung 150 x).

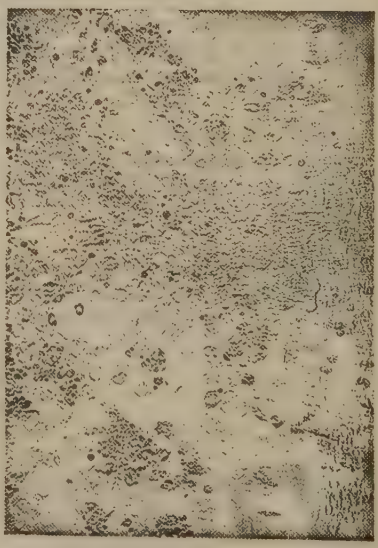
1

2

3

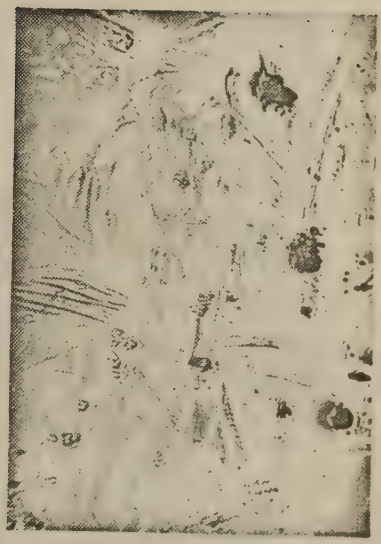


4

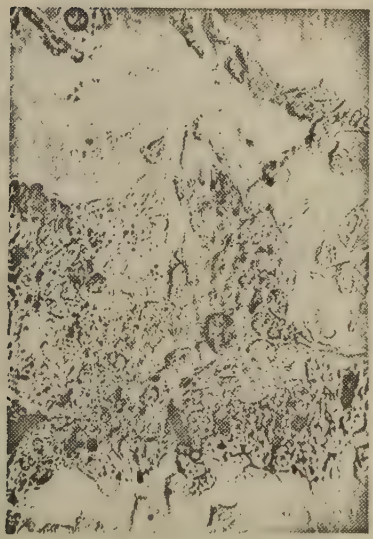


5

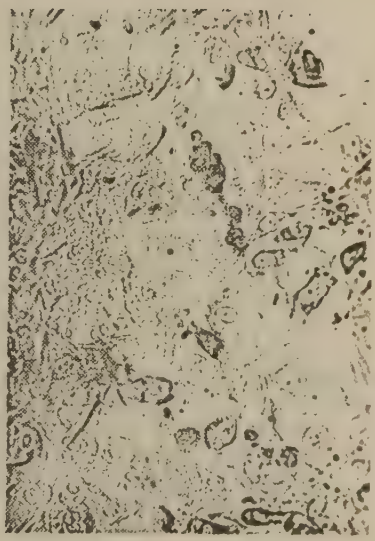
6



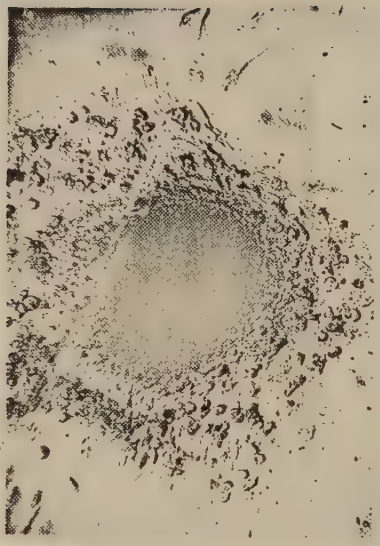
7



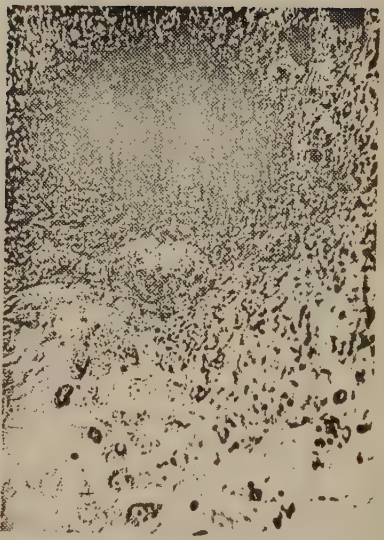
8



9

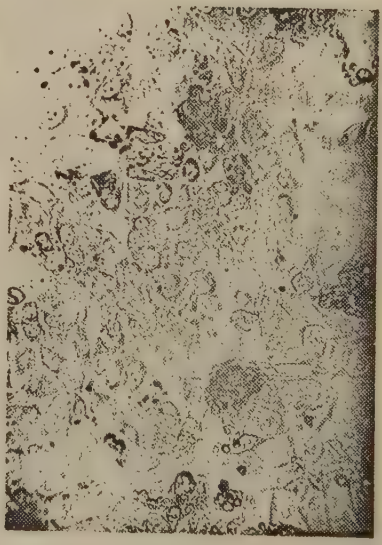


10



11

12



Literatur

1. ROUS, Peyton: Transmission of a malignant new growth by means of a cell-free filtrate. J. Am. Assoc. 56, 198 (1911)

2. GERBER, P.: Tumors induced in hamsters by simian virus SV 40-persistent subviral infection. Science 140, 889 (1963)

3. EARLE, W.R.: Production of malignancy "in vitro" IV. The mouse fibroblast cultures and changes seen in the living cells. J. Natl. Cancer Inst. 4, 165-212 (1943)

4. DULBECCO, R.: Transformation of cells in vitro by DNA-containing viruses. J. Am. Med. Assoc. 190, 721 (1964)

5. TRENTIN, J.J., YABE, Y. and TAYLOR, G.: The quest for human cancer viruses. Science 137, 835 (1962)

6. GIRARDI, A.J., HILLEMAN, M.R. and SWICKEY, R.W.: Test in hamsters for onkogenic quality of ordinary viruses including adenovirus type 7. Proc. Soc. Expt. Biol. Med. 115, 1141, (1964)

7. GIRARDI, A.J., LARSSON, V.M. and HILLEMAN, M.R.: Further tests in hamsters for onkogenie quality of ordinary viruses and mycoplasma with correlative review. Proc. Soc. Expt. Biol. Med. 118, 173 (1965)

8. PEREIRA M.S., PEREIRA, H.G. and CLARKE, S.K.R.: Human adenovirus type 31. A new serotype with oncogenic properties. Lancet I, 21, (1965)

9. BLACK, P.H., ROWE, W.P. and HUEBNER, R.J.: An analysis of SV40 - induced transformation of hamster kidney tissue in vitro. II. Studies of three clones derived from a continuous lines of transformed cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 50, 847 (1963)

10. FREEMAN, A.E., BLACK, P.H., WOLFORD, R. and HUEBNER, R.J.: Adenovirus type 12-Rat Embryo Transformation System. J. of Viology, Apr. 1967, p362-367. Vol 1, No. 2 (1967)

11. FREEMAN, A.E., BLACK, P.H., VANDERPOOL, E.A., HENRY, P.H., AUSTIN, J.B. and HUEBNER, R.J.: Transformation of primary rat embryo cells by adenovirus type 2. Proc. N.A.S. 58, 1205 (1967)

12. v.d. NOORDAA, J.: Transformation of Rat Kidney Cells by Adenovirus Type 12, J. gen. Virol. 2, 269-272 (1968)

13. v.d. NOORDAA, J.: Transformation of rat cells by adenovirus types 1, 2 and 3. J. gen. Virol. 3, 303-304 (1968)

14. FUJINAGA, K. and GREEN, M.: The mechanism of viral carcinogenesis by DNA mammilian viruses: Viral spezific RNA in polyribosomes of adenovirus tumor and transformed cells. Proc. N.A.S., 55, 6, 1567-1574(1966)

15. FUJINAGA, K. and GREEN, M.: Mechanism of viral carcinogenesis by DNA mammilian viruses, II. viral-specific RNA in tumor cells induced by "weakly" oncogenic human adenoviruses. Proc. N.A.S. 57, 3,806 - 812 (1967)

16. YAMANE, I. and KUSANO, T.: In vitro transformation of cells of hamster brain by adenovirus type 12. Nature 213, 187-188 (1967)

17. KUSANO, T. and YAMANE, I.: General characteristics of the cells transformed in vitro by human adenovirus type 12. Tohoku J. exp. Med. 92, 151-160 (1967)

18. HUEBNER, R.J.: Adenovirus-directed tumor and antigens perspectivs in Virol. 5, 147 - 166 (1967)

19. HUEBNER, R.J., ROWE, W.P. and LANE, W.T.: Oncogenic effekts in hamsters of human adenovirus types 12 and 18. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 48, 2051 (1962)

20. McBRIDE, W.D. and WIENER, A.: In vitro transformation of hamster kidney cells by human adenovirus type 12. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 115, 870-874 (1964)

21. POPE, J.H. and ROWE, W.P.: Immunofluorescent studies of adenovirus 12 tumors and of cells transformed or infected by adenoviruses. J. exp. Med. 120, 577 (1964)

22. LEVINTHAL, J.D. and PETERSEN, W.: In vitro transformation and immunfluorescence with human adenovirus type 12 in rat and rabbit kidney cells. Fedn. Proc. Fedn Am. Socs exp. Biol. 24, 174 (1965)

23. ROWE, W.P., HUEBNER, R.J., GILMORE, L.K., PARROT, R.H. and WARD, T.G.: Isolation of cytopathogenie agent from human adenoids undergoing spontaneous degenerations in tissue culture. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 84, 570 (1953)

24. HUEBNER, R.J.: In first international conference on vaccines against viral and rickettsial diseases of man, Pan American Health Organisation publ. (Washington, D.C.: PAHO, 1967), p. 73

25. McALLISTER, R.M., NICOLSON, M.O., REED, G., KERN, J., GILDEN, R.V. and HUEBNER, R.J.: Transformation of rodent cells by adenovirus 19 and other group D adenoviruses. J. Nat. Cancer Inst. 43, 917-923 (1969)

26. ROSEN, L.: A hemagglutination-inhibition, technice for typing of adenoviruses. Amer. J. HYG. 71, 120-128 (1960)

27. REED, S.E.: Transformation of hamster cells in vitro by type 12. J. gen. Virol. 1, 405-412 (1967)

28. ROW, W.P., HARTLEY, J.W. and HUEBNER, R.J.: Serotype composition of the adenovirus group. Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 97, 465 (1968)

29. McALLISTER, R.M., NICOLSON, M.O., LEWIS, A.M., MACPHERSON I. and HUEBNER, R.J.: Transformation of rat embryo cells by adenovirus Type 1. J. gen. Virol. 4, 29-36 (1969)

30. CASTO, B.C.: Adenovirus transformation of hamster embryo cells. J. Virol. Vol 2, No. 4, 376-383 (1968)

31. EAGLE, H.: Nitrition needs of mammalian cells in tissue culture. Science 122, 501 - 504 (1955)

32. SCHELL, K. and SCHMIDT, M.: Adenovirus transformation of hamster embryo cells I - III. Archiv für die gesamte Virusforschung 24, 332 - 360 (1968)

33. TRENTIN, J.J., JOOSIER v., G.L., and SAMPER, L.: The oncogenicity of human adenoviruses in hamsters. Proc. Soc. expt. Biol. Med. 127, 683-689 (1968)

34. McALLISTER, R.M. and MACPHERSON, I.: Transformation of a hamster cell line by adenovirus type 12. J. gen. Virol. 2, 99-106 (1968)

35. FREEMAN, A.E., CALISHER, C.H., PRICE, P.J., TURNER, H.C. and HUEBNER, R.J.: Calcium sensitivity of cell cultures derived from adenovirus-induces tumors. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 122, 563-568 (1966)

Lebenslauf

Am 22. 2. 1945 wurde ich als Sohn des Lungenfacharztes Dr. med. Walter Berdel und seiner Ehefrau Dr. jur. Sigrid Berdel geb. zur Nieden, in Sulingen geboren. Ich besuchte von Ostern 1952 bis Weihnachten 1954 die Volksschule in Jesteburg und von Weihnachten 1954 bis Ostern 1956 die Volksschule in Wohltorf bei Hamburg. Nach kurzem Besuch der Sachsenwaldoberschule in Reinbek, wurde ich im September 1956 in die fünfte Klasse des Landschulheimes am Solling in Holzminden aufgenommen, wo ich den altsprachlichen Schultyp besuchte. Nach bestandenem Abitur im Februar 1965 wurde ich in Innsbruck zum Medizinstudium zugelassen. Dort habe ich im Februar 1968 das I. medizinische Rigorosum abgelegt. Zu dem klinischen Teil des Medizinstudiums wurde ich an der Universität des Saarlandes in Homburg zugelassen und bestand dort im Juni 1971 die ärztliche Prüfung. Zehn Monate meiner Medizinalassistentenzeit habe ich an dem Städtischen Krankenhaus in Offenburg verbracht. Im Juli und August 1972 war ich Medizinalassistent an der Virologischen Abteilung des Instituts für Hygiene und Mikrobiologie der Universität des Saarlandes in Homburg. Ab 1. September 1972 bin ich Assistent an der Universitäts-Kinderklinik in Homburg.

Danksagung

Herrn Professor Dr. med. R. WIGAND möchte ich für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bei Planung und Durchführung der Arbeit ganz besonders danken.

Herrn Professor Dr. Dr. W. ZIMMERMANN danke ich für die Gewährung eines Arbeitsplatzes.

Frau A. BRACHETTI, Frau K. DEBUSMANN, Fräulein D. KUNZE und Frau I. MAURER sei für die mir erwiesene Hilfe aufrichtig gedankt.

Zu danken habe ich auch den Professoren J. v. d. NOORDAA (Amsterdam), N. SEEMAYER (Freiburg), E. TIESLER und S. TRANEKJER (Homburg) für Unterstützung und Diskussion.